

# Мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку собак

## на ранніх пасажах культивування *in vitro*

**Анотація.** Наведено результати цитогенетичних досліджень стовбурових клітин кісткового мозку собак під час культивування *in vitro*. Виявлено кількісні порушення хромосомного апарату. Водночас дані мікроядерного тесту показали, що під час *in vitro* культивування частка клітин із мікроядром і двоядерних клітин були в межах норми. Мітотичний індекс відповідав частоті апоптозних клітин.

**Ключові слова:** мезенхімальні стовбурові клітини, кістковий мозок, моноклеарні клітини, цитогенетичний аналіз, хромосоми, анеуплоїдія, поліплоїдія, апоптозні клітини.

**The karyotype description of dogs mesenchymal stem cells bone marrow on early cultivation passage *in vitro* at enzymatic dissociation of cellular monolayer** ANATOLIY Y. Mazurkevych, MYKOLA O. Malyuk (National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine), LYUBOV F. Starodub (Institute of Animal Breeding and Genetics of NAAS of Ukraine).

**Abstract.** Conducted cytogenetic studies of dogs mesenchymal stem cells bone marrow during cultivation *in vitro* found quantitative violation of the chromosome apparatus. The percentage of aneuploid cells of first and second passages slightly higher than the spontaneous level of this variability. The MSC percentage of aneuploidy of third and fourth passages in 1,6 and 2.2 times respectively higher than the spontaneous aneuploidy, which is characteristic for cells in bone marrow of dogs. The results of micronucleus test showed that during *in vitro* cultivation of cells fraction with the microkernel and dual cells were within normal limits. Mitotic index posted a frequency of apoptotic cells.

**Key words:** mesenchymal stem cells, bone marrow, mononuclear cells, cytogenetic analysis, chromosomes, aneuploidy, polyploidy, apoptotic cells.



**А.МАЗУРКЕВИЧ**, докт. вет.наук  
**М.МАЛЮК**, канд.вет.наук  
 Національний університет біоресурсів  
 і природокористування України  
**Л.СТАРОДУБ**, канд. с.-г. наук  
 Інститут розведення  
 і генетики тварин НААН України

Незважаючи на інтенсивні дослідження в області біології мезенхімальних стовбурових клітин, результати досліджень стабільності або каріотипових характеристик цих клітин неоднозначні. У наукових колах оприлюднюються протилежні точки зору на вірогідність каріотипових змін в культурах, які використовують для клітинної терапії. Велика частина науковців вважають, що виникнення хромосомних

**Таблиця 1**  
**Результати цитогенетичного аналізу мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку собак першого – четвертого пасажів ( $M \pm m$ ,  $n=4$ )**

| № пасажу  | Кількість метафаз, n | Анеуплоїдія, %  | Поліплоїдія, % |
|-----------|----------------------|-----------------|----------------|
| Перший    | 30                   | 16,6 $\pm$ 1,5  | –              |
| Другий    | 30                   | 18,0 $\pm$ 1,4  | –              |
| Третій    | 30                   | 25,0 $\pm$ 2,10 | –              |
| Четвертий | 30                   | 33,3 $\pm$ 2,30 | –              |

аномалій характеризують генетичну нестабільність культури, яка пов'язана з втратою теломерної ДНК і може призвести до злоякісної трансформації [14, 16]. Водночас, існують погляди, що клітини з каріотиповими змінами не шкідливі для трансплантації, тому що їх частка в культурі незначна [8]. Ряд робіт по дослідженню каріотипової стабільності МСК у процесі культивування свідчить на користь довготривалого культивування до 25 пасажу. При цьому, не спостерігається розвитку хромосомних або відхилень генетичної стабільності клітин навіть після долання ліміту Хейфліка (після 63 циклів подвоєння). [7, 10, 17].

Інші автори у своїх дослідженнях вказують на можливість спонтанної трансформації МСК, виділених із КМ і ЖТ [11], що вказує на формування пухлин із цих клітин у тварин під час пасажування *in vivo* [15].

Навіть при короткочасовому культивуванні вірогідність злоякісної трансформації може різко підвищитись в результаті геномних мутацій, при цьому існуючі клони культивуючих клітин із аномальним каріотипом одержують перевагу під час мітотичного ділення порівняно з клітинами, які мають нормальний каріотип [2].

У зв'язку із суперечливими науковими результатами різних авторів єдиної думки щодо збереження у стовбурових клітин нормального хромосомного набору при пасуванні до цих пір не існує [1, 5, 9, 18].

Враховуючи наведені вище факти, проведення каріотипової характеристики мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку (МСК КМ) собак під час культивування *in vitro* є досить актуальним і своєчасним завданням. Це дасть змогу безпечно використовувати МСК для клітинно-регенеративної терапії.

**Мета досліджень: встановити закономірності хромосомної мінливості мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку собаки на ранніх пасажах культивування *in vitro* та провести мікроядерний тест.**

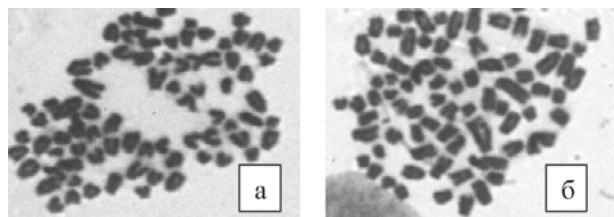
Цитогенетичний моніторинг включав аналіз 30 метафазних пластинок стовбурових клітин собаки першого, другого, третього та четвертого пасажів, одержаних за допомогою модифікованого стандартного цитогенетичного методу [6, 12].

У процесі досліджень враховували: кількісні порушення хромосом – анеуплоїдію (А), поліплоїдію (ПП) та структурні аберації – розриви хромосом (ХР) і хроматид (ХМ). На цих самих препаратах провели мікроядерний тест: під-

рахували кількість двоядерних (ДЯ) клітин, клітин із мікроядром (МЯ), мітотичний індекс (МІ), апоптозні клітини (АП). Частоту ДЯ, МЯ, МІ, АП вираховували на 1000 клітин (‰).

**Результати досліджень.** Стабільність каріотипу мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) кісткового мозку собаки на ранніх пасажах культивування *in vitro* порівнювали із мінливістю каріотипу клітин кісткового мозку за спонтанного мутагенезу. Результати цитогенетичного моніторингу МСК кісткового мозку собаки свійського першого - четвертого пасажів показали, що для цих клітин характерні кількісні порушення каріотипу (анеуплоїдія), частота якої становила від 16,6% до 33,3% відповідно (табл. 1).

Для каріотипу собак характерна спонтанна анеуплоїдність, виявлена у 5-15% клітин кісткового мозку [3]. Відсоток анеуплоїдних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку собаки першого пасажу становив 16,6, другого – 18,0 що незначно перевищує спонтанний рівень (5-15%) цієї мінливості, виявленої у клітинах кісткового мозку. Відсоток МСК із анеуплоїдією третього та четвертого пасажу дорівнював 25,0 та 33,3%, що 1,6 та у 2,2 рази (відповідно) більше рівня спонтанної анеуплоїдності, характерної для клітин кісткового мозку [3]. Різниця середніх величин цієї мінливості між другим і третім, другим і четвертим пасажами виявилася достовірною при  $P > 0,95$  та  $P > 0,99$  відповідно. Клітин із кратним збільшенням числа хромосом та їх структурними порушеннями виявлено не було.



а- метафазна пластинка в нормі ( $2n=78$ );

б- кількісні порушення каріотипу (анеуплоїдія  $2n=74$ )  
 Частота клітин із мікроядрами (1,3‰ - 4,5‰) знаходилася у межах контролю, оскільки, частота появи

**Результати мікроядерного тесту МСК собак на ранніх пасажах культивування ( $M \pm m$ ,  $n=4$ )**

| № пасажу  | Клітини із мікроядром, ‰ | Двоядерні клітини, ‰ | Мітотичний індекс, ‰ | Апоптоз, ‰ |
|-----------|--------------------------|----------------------|----------------------|------------|
| Перший    | 1,3±0,01                 | -                    | 1,5±0,07             | 1,0±0,01   |
| Другий    | 1,5±0,07                 | 1,8±0,05             | 1,9±0,03             | 1,1±0,04   |
| Третій    | 2,3±0,04                 | 1,6±0,01             | 2,0±0,04             | 2,0±0,03   |
| Четвертий | 4,5±0,02                 | 2,0±0,03             | 8,0±0,05             | 8,1±0,06   |

клітин із мікроядрами у нормі для ссавців знаходиться у межах 1,6 - 5,6‰ [20]. Частота двоядерних мезенхімальних стовбурових клітин другого - четвертого пасажів становила 1,6 та 2,0‰ і знаходилася в межах параметрів, які характерні для ссавців [4]. У популяції клітин першого пасажу двоядерних МСК виявлено не було. Частота мітотичного індексу узгоджувалася прямим пропорційним співвідношенням із частотою апоптозних клітин.

#### Висновки

Встановлено достовірну різницю середніх величин підвищення кількісних порушень хромосом (анеуплоїдії) між другим, третім та четвертим пасажами.

Виявлені підвищені межі кількісних порушень хромосом у популяціях МСК кісткового мозку собаки третього та четвертого пасажів у порівнянні із спонтанною анеуплоїдністю клітин кісткового мозку.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. **Бочков Н.П.** и др. Хромосомная изменчивость мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека. // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2007. № 1. С. 11–15.
2. **Бочков Н.П.** и др. Цитогенетическое исследование мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека в процессе культивирования. // *Медицинская генетика*. 2009. Т. 8. № 12.
3. **Графодатский А.С.** Генетика собаки. / Графодатский А.С., Железова А.И., Князев С.П. // Новосибирск: Из-во Новосибирского ун-та, 1999. – 608 с.
4. **Джус П.П.** Видоспецифічність дестабілізації каріотипів сільськогосподарських тварин за радіаційного та інфекційного впливу : автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.15 / П. П. Джус. – К., 2012. – 20 с.
5. **Baker D.E.** et al. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. // *Nat. Biotechnol.* 2007. Т. 25. № 2. С. 207–215.;
6. **Barch M.J.** Cytogenetics laboratory manual. / Barch M.J., Knutsen T., Spurbeck J.L. // – Lippincot – Raven. – 1997. – 668 p.
7. **Bernardo M.E.** et al. Human bone marrow derived

**Таблиця 2**

*mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. // Cancer Res.* 2007. Т. 67. № 19. С. 9142–9149.

8. **Buzzard J.J.** et al. Karyotype of human ES cells during extended culture. // *Nat. Biotechnol.* 2004. Т. 22. № 4. С. 381–382.

9. **Caisander G.** et al. Chromosomal integrity maintained in five human embryonic stem cell lines after prolonged in vitro culture. // *Chromosome Res.* 2006. Т. 14. № 2. С. 131–137.

10. **Mareschi K.** et al. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. // *J. Cell. Biochem.* 2006. Т. 97. № 4. С. 744–754.

11. **Meza-Zepeda L.A.** et al. High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence // *J. Cell. Mol. Med.* 2008. Т. 12. № 2. С. 553–563.

12. **Moorhead P.S.** Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. / Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.I. et al // *Exp. Cell Res.* – 1960. – Vol. 20, N 3. – P. 613 – 616.

13. **Murnane J.P.** Telomere dysfunction and chromosome instability. // *Mutat. Res.* 2012. Т. 730. № 1-2. С. 28–36.

14. **Pathak S.** et al. Telomere dynamics, aneuploidy, stem cells, and cancer (review). // *Int. J. Oncol.* 2002. Т. 20. № 3. С. 637–641.

15. **Serakinci N.** et al. Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. // *Oncogene.* 2004. Т. 23. № 29. С. 5095–5098.

16. **Shiras A.** et al. Spontaneous transformation of human adult nontumorigenic stem cells to cancer stem cells is driven by genomic instability in a human model of glioblastoma. // *Stem Cells.* 2007. Т. 25. № 6. С. 1478–1489.

17. **Soukup T.** et al. Mesenchymal stem cells isolated from the human bone marrow: cultivation, phenotypic analysis and changes in proliferation kinetics. // *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2006. Т. 49. № 1. С. 27–33

18. **Suemori H.** et al. Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. Т. 345. № 3. С. 926–932.

19. **Wang Y.** et al. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. // *Cytherapy.* 2005. Т. 7. № 6. С. 509–519.

20. **Xigong Xikum.** Shi Liming Observations on micronuclei of immature germ cells. *Zool. Res.* – 1990. – V. 11. - № 4. – P. 343-348.